

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-289867
(43)Date of publication of application : 14.10.2003

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C12J 1/04
C12N 1/21
C12N 9/88
//(C12N 1/21
C12R 1:02)

(21)Application number : 2002-098589 (71)Applicant : MITSUKAN GROUP HONSHA:KK
(22)Date of filing : 01.04.2002 (72)Inventor : NAKANO SHIGERU

(54) ACONITASE GENE OF ACETOBACTER, ACETOBACTER BRED BY USING THE GENE, AND METHOD FOR PRODUCING VINEGAR BY USING THE ACETOBACTER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new aconitase gene associated with acetic acid resistance, a microorganism by using the gene, and to provide a method for producing a vinegar having a high concentration of acetic acid by using the microorganism.

SOLUTION: A protein having a specific amino acid sequence derived from the acetobacter and aconitase activity, the DNA encoding the protein, the microorganism containing the DNA and the method for producing the vinegar having the high concentration of acetic acid by using the microorganism are provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.03.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-289867

(P2003-289867A)

(43) 公開日 平成15年10月14日 (2003.10.14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 J 1/04	1 0 3 Z 4 B 0 2 4
C 1 2 J 1/04	1 0 3	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 8
C 1 2 N 1/21		9/88	4 B 0 5 0
9/88		C 1 2 R 1:02	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 15/00	ZNAA
			OL (全 23 頁) 最終頁に続く
		審査請求 未請求 請求項の数 9	

(21) 出願番号 特願2002-98589(P2002-98589)

(22) 出願日 平成14年4月1日 (2002.4.1)

(71) 出願人 398065531

株式会社ミツカングループ本社

愛知県半田市中村町2丁目6番地

(72) 発明者 中野 篤

愛知県知多郡阿久比町卯坂字坂部28

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

F ターム(参考) 4B024 AA05 CA04 DA05 EA04 FA02

GA11

4B028 BC07 BL22 BP01 BX03

4B050 CC01 CC03 DD02 LL02

4B065 AA01X AA02X AA02Y AB01

BA02 BB06 BB08 CA10 CA41

(54) 【発明の名称】 酢酸菌のアコニターゼ遺伝子、該遺伝子を用いて育種された酢酸菌、及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 酢酸耐性に関与する新規なアコニターゼ遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物並びに該微生物を用いて高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供すること。

【解決手段】 アセトバクター由来の特定のアミノ酸配列を有し、アコニターゼ活性を有するタンパク質、これらタンパク質をコードするDNA、これらDNAを含む微生物及びこれら微生物を用いた高酢酸濃度の食酢の製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の(a)又は(b)のタンパク質。

(a)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】 下記の(a)又は(b)のタンパク質。

(a)配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項3】 下記の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項4】 下記の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項5】 下記の(a)又は(b)の塩基配列からなるDNA。

(a)列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号354～3065からなるDNA。

(b)配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号354～3065からなる塩基配列からなるDNA又は該DNAの一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項6】 下記の(a)又は(b)の塩基配列からなるDNA。

(a)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号489～3179からなるDNA。

(b)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号489～3179からなる塩基配列からなるDNA又は該DNAの一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項7】 請求項3, 4, 5又は6に記載のDNA

を細胞内に含むアコニターゼ活性を有する微生物又は前記アコニターゼ活性を有しあつ酢酸耐性が増強された微生物。

【請求項8】 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌であることを特徴とする請求項7に記載の微生物。

【請求項9】 請求項7又は8に記載の微生物をアルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

10 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微生物に由来するアコニターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む微生物、特にアセトバクター属(Aacetobacter)及びグルコンアセトバクター属(Gluconacetobacter)に属する酢酸菌、及びこれらの微生物を用いて高濃度の酢酸を含有する食酢を効率良く製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】酢酸菌は食酢製造に広く利用されている微生物であり、特にアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌が工業的な酢酸発酵に利用されている。酢酸発酵では、培地中のエタノールが酢酸菌によって酸化されて酢酸に変換され、その結果、酢酸が培地中に蓄積することになるが、酢酸は酢酸菌にとっても阻害的であり、酢酸の蓄積量が増大して培地中の酢酸濃度が高くなるにつれて酢酸菌の増殖能力や発酵能力は次第に低下する。

【0003】そのため、酢酸発酵においては、より高い酢酸濃度でも増殖能力や発酵能力が低下しないこと、すなわち酢酸耐性の強い酢酸菌を開発することが求められており、その手段として、酢酸耐性に関与する遺伝子(酢酸耐性遺伝子)をクローニングし、その酢酸耐性遺伝子を用いて酢酸菌を育種、改良することが試みられて

いる。

【0004】これまでの酢酸菌の酢酸耐性遺伝子に関する知見としては、アセトバクター属の酢酸菌の酢酸耐性を変異させて酢酸感受性にした株を元の耐性に回復させることのできる相補遺伝子として、クラスターを形成する3つの遺伝子(aarA, aarB, aarC)がクローニングされていた(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.), 172巻, 2096頁, 1990年)。この内、aarA遺伝子はクエン酸合成酵素をコードする遺伝子であり、又、aarC遺伝子は酢酸の資化に関係する酵素をコードする遺伝子であると推定されたが、aarB遺伝子については機能が不明であった(ジャーナル・オブ・ファーメンテイション・アンド・バイオエンジニアリング(J. Ferment. Bioeng.), 76巻, 270頁, 1993年)。

【0005】これらの3つの酢酸耐性遺伝子を含む遺伝

子断片をマルチコピープラスミドにクローニングし、アセトバクター・アセチ・サブスペシーズ・ザイリナムIFO3288 (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO3288) 株に形質転換して得られた形質転換株は、酢酸耐性の向上レベルが僅かでしかなく、また実際の酢酸発酵での能力の向上の有無については不明であった（特開平3-219878号公報）。

【0006】一方、酢酸菌からクローニングされた膜結合型アルデヒド脱水素酵素（ALDH）をコードする遺伝子を酢酸菌に導入することによって、酢酸発酵において最終到達酢酸濃度の向上が認められた例が特開平2-2364号公報に開示されている。しかし、ALDHはアルデヒドを酸化する機能を有する酵素であって酢酸耐性に直接関係する酵素ではないことから、ALDHをコードする遺伝子が真に酢酸耐性遺伝子であるとは断定できないものであった。

【0007】このような実情から、酢酸耐性を実用レベルで向上させうる機能を有するタンパク質をコードする新規な酢酸耐性能を有するタンパク質の遺伝子を取得し、また取得した酢酸耐性遺伝子を用いて、より強い酢酸耐性を有する酢酸菌を育種することが望まれていた。

【0008】

【発明が解決するための課題】本発明は、酢酸菌に属する微生物由来の酢酸耐性に関する新規なアコニターゼ遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物の酢酸耐性を向上させる方法、特に酢酸菌に属する微生物の酢酸耐性を向上させる方法、さらに酢酸耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供することを目的とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、酢酸存在下でも増殖し、発酵することができる酢酸菌には、他の微生物には存在しない特異的な酢酸耐性に関する遺伝子が存在するとの仮説を立て、こうした遺伝子を用いれば、従来以上に微生物の酢酸耐性を向上させることができ、さらには高濃度の酢酸を含有する食酢の効率的な製造法を開発することが可能になると考えた。

【0010】従来の酢酸耐性遺伝子の取得方法は、酢酸菌の酢酸感受性の変異株を相補する遺伝子をクローニングする方法などが一般的であった。しかし、このような方法では産業上有用な酢酸耐性遺伝子を見出ることは困難であると考え、鋭意検討した結果、本発明者らは、酢酸菌から酢酸耐性遺伝子を見出す方法として、酢酸の存在下で特異的に発現しているタンパク質を検索し、そのタンパク質をコードする遺伝子を取得するといった、從来全く行われていなかった方法を開発した。

【0011】この方法によって、実際に食酢製造に用いられているアセトバクター属とグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌から、酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有する新規な酢酸耐性能を有するタンパク質

の遺伝子をクローニングすることに成功した。

【0012】得られたこの遺伝子は、DDBJ/EMBL/Genbankの検索の結果、大腸菌などで見出されている、アコニターゼaconitase（アコニット酸ヒドロラーゼaconitate hydratase）と称される一群のタンパク質のアミノ酸配列と相同性を示す部分があるところから、酢酸菌のアコニターゼ（アコニット酸ヒドロラーゼ）をコードする遺伝子（アコニターゼ遺伝子）であると推定された。

【0013】しかし、取得された酢酸菌のアコニターゼ遺伝子は、大腸菌などの他の微生物で見出されている既知のアコニターゼ遺伝子とは相同性がきわめて低くかったことから、他のアコニターゼ遺伝子と似ているものの該アコニターゼ遺伝子は酢酸菌に特異的な新規タンパク質をコードする新規遺伝子であることが判った。一方、今回取得したアセトバクター属に属する酢酸菌とグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌のアコニターゼ遺伝子について相同性を比較したところ、両者の相同性は約70%であり、酢酸菌間での相同性は高かった。

【0014】また、該遺伝子をプラスミドベクターに連結して酢酸菌に形質転換し、コピー数を増幅させた形質転換株においては、アコニット酸ヒドロラーゼ活性が約2倍増大し、該遺伝子が酢酸菌のアコニターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であることが確認されると同時に、顕著に酢酸耐性が向上することが確認された。さらに、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合には、増殖速度が向上する上に、生酸速度が向上し、さらに最終到達酢酸濃度が顕著に向上去ることなども見出し、本発明を完成するに至った。

【0015】すなわち本発明は、以下の（1）～（9）からなるものである。

（1）以下の(a)又は(b)のタンパク質。

(a)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（b）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質。

（2）以下の(a)又は(b)のタンパク質。

（a）配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（b）配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質。

（3）以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b)配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列におい

- 3 -

て、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質。

(4) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b)配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質。

(5) 以下の(a)又は(b)の塩基配列からなるDNA。

(a)配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号354～3065からなるDNA。

(b)配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号354～3065からなる塩基配列からなるDNA又は該DNAの一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(6) 以下の(a)又は(b)の塩基配列からなるDNA。

L

(a)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号489～3179からなるDNA。

(b)配列番号3に記載の塩基配列のうち、塩基番号489～3179からなる塩基配列からなるDNA又は該DNAの一部と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アコニターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(7) (3), (4), (5)又は(6)に記載のDNAを細胞内に含むアコニターゼ活性を有する微生物又は前記アコニターゼ活性を有しつつ酢酸耐性が増強された微生物。

(8) 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌であることを特徴とする

(7)に記載の微生物。

(9) (7)又は(8)に記載の微生物をアルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

【0016】本発明によれば、微生物に対して、酢酸に対する耐性を付与し、増強することができる。そして、アルコール酸化能を有する微生物、特に酢酸菌においては、酢酸に対する耐性が顕著に向上升し、培地中に高濃度の酢酸を効率良く蓄積する能力を付与することができる。

【0017】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のDNA

本発明のDNAは、アコニターゼ（アコニット酸ヒドロターゼ）活性を有し、且つ酢酸耐性を向上させる機能を有する配列番号2又は4に示すアミノ酸配列を有するダ

ンパク質をコードする塩基配列を包含し、該塩基配列の調整要素、及び該遺伝子の構造部分を含むものである。

本発明のDNAとして、具体的には、配列表配列番号1の塩基番号354～3065又は配列表配列番号3の489～3179からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。

【0018】配列番号1又は3に示す塩基配列は、DDBJ/EMBL/Genbank及びSWISS-PROTにおいてホモロジー検索したところ、アミノ酸配列レベルで大腸菌(*Escherichia coli*)のAcnA遺伝子と55.1%、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)のAcn遺伝子とも56.1%の相同性を示すことが分かったが、いずれも50%台の低い相同性であり、これらのタンパク質をコードする遺伝子とは異なる新規なものであることが明白であった。なお、上記のAcnA遺伝子やAcn遺伝子などのアコニターゼ遺伝子が酢酸耐性と関係していることは全く知られていない。

【0019】本発明のDNAはその塩基配列が明らかとなつたので、該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマー1(配列番号5)及びプライマー2(配列番号6)を用い、酢酸菌、例えばアセトバクター・アセチNo.1023(*Acetobacter aceti* No.1023; FERM BP-2287)のゲノムDNAを用いるポリメラーゼ・

チーン・リアクション(PCR反応)(トレンド・オープ・ジェネティックス(Trends Genet.)5巻、185頁、1989年)によって、または該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、ゲノムDNAライブラリーを用いるハイブリダイゼーションによって得ることができる。オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、市販されている種々のDNA合成機を用いて定法に従って合成できる。また、PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems)製のサーマルサイクルGeneAmp 2400などを用い、Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)やKOD-Pius-(東洋紡績社製)を使用して、定法に従って行なうことができる。

【0020】本発明のアコニターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAは、コードされるタンパク質のアコニターゼ活性が損なわれない限り、1又は複数の位置で1又は数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたタンパク質をコードするものであっても良い。

【0021】このようなアコニターゼ活性を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えは部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が欠失、置換又は付加されるように塩基配列を改変することによっても取得され得る。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得することができる。

50 【0022】また、一般的にタンパク質のアミノ酸配列

およびそれをコードする塩基配列は、種間、株間、変異体、変種間でわずかに異なることが知られているので、実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、酢酸菌全般、中でもアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の種、株、変異体、変種から得ることが可能である。

【0023】具体的には、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌、又は変異処理したアセトバクター属やグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌、これらの自然変異株若しくは変種から、例えば配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基配列番号354～3065からなる塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつアコニターゼ（アコニット酸ヒドラターゼ）活性を有し、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、該タンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0024】ここでいうストリンジエントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い核酸同士、例えば70%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のハイブリダイゼーションの洗浄条件、例えば1×SSCで0.1%SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件などが挙げられる。

【0025】(2) 本発明の酢酸菌

本発明の酢酸菌はアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の細菌をさし、酢酸耐性が増強されたアセトバクター属細菌及びグルコンアセトバクター属、または酢酸耐性が低下したアセトバクター属細菌及びグルコンアセトバクター属である。

【0026】アセトバクター属細菌として具体的には、アセトバクター・アセチ（*Acetobacter aceti*）が挙げられ、アセトバクター・アセチNo. 1023 (*Acetobacter aceticus* No. 1023) 株（特許生物寄託センターにFERM BP-2287として寄託）が例示される。

【0027】また、グルコンアセトバクター属細菌としては、グルコンアセトバクター・エンタニイ（*Gluconacetobacter entanii*）が挙げられ、アセトバクター属よりグルコンアセトバクター属へ変更になった、アセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株（特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託）が例示される。酢酸耐性の増強は、例えばアコニターゼ遺伝子の細胞内のコピー数を増幅すること、又は、該遺伝子の構造遺伝子を含むDNA断片をアセトバクター属細菌中で効率よく機能するプロモーター配列に連結して得られる組換えDN

Aを用いて、アセトバクター属細菌を形質転換することによって増強することができる。

【0028】また、染色体DNA上の該遺伝子のプロモーター配列を、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌中で効率よく機能する他のプロモーター配列、例えば大腸菌のプラスミドpBR322（宝酒造社製）のアンピシリン耐性遺伝子、プラスミドpHSG289（宝酒造社製）のカナマイシン耐性遺伝子、プラスミドpHSG396（宝酒造社製）のクロラムフェニコール耐性遺伝子、β-ガラクトシダーゼ遺伝子などの各遺伝子のプロモーターなどの酢酸菌以外の微生物由来のプロモーター配列に置き換えることによっても、酢酸耐性を増強することができる。

【0029】該遺伝子の細胞内コピー数の増幅は、該遺伝子を保持するマルチコピーベクターをアセトバクター属細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。すなわち、該遺伝子を保持するプラスミド、トランスポゾン等をアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。

【0030】マルチコピーベクターとしては、pMV24（アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー（Appl. Environ. Microbiol.）55巻、171頁、1989年）やpTA5001(a)、pTA5001(b)（特開昭60-9488号公報）などが挙げられ、染色体組み込み型ベクターであるpMVL1（アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー（Agric. Biol. Chem.）52巻、3125頁、1988年）も挙げられる。また、トランスポゾンとしては、MuやIS1452などが挙げられる。

【0031】アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌へのDNAの導入は、塩化カルシウム法（アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー（Agric. Biol. Chem.）49巻、p. 2091, 1985年）やエレクトロポレーション法（バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー（Biosci. Biotech. Biochem.）58巻、974頁、1994年）等によって行なうことができる。アルコール酸化能を有するアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌において、上記のようにしてその酢酸耐性を増強すると、酢酸の生産量や生産効率を増大させることができる。

【0032】(3) 食酢製造法
上記のようにして、アコニターゼ遺伝子のコピー数が増幅したことにより酢酸耐性が選択的に増強されたアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌であって、アルコール酸化能を有するものをアルコール含有培地で培養し、該培地中に酢酸を生産蓄積せしめることにより、食酢を効率よく製造することができる。

【0033】本発明の製造法における酢酸発酵は、従来

の酢酸菌の発酵法による食酢の製造法と同様にして行なえば良い。酢酸発酵に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、エタノールを含有し、必要があれば使用菌株が生育に要求する栄養源を適当量含有するものであれば、合成培地でも天然培地でも良い。炭素源としては、グルコースやシュークロースをはじめとする各種炭水化物、各種有機酸が挙げられる。窒素源としては、ペプトン、発酵菌体分解物などの天然窒素源を用いることができる。

【0034】また、培養は、静置培養法、振盪培養法、通気攪拌培養法等の好気的条件下で行ない、培養温度は通常30℃で行なう。培地のpHは通常2.5~7の範囲であり、2.7~6.5の範囲が好ましく、各種酸、各種塩基、緩衝液等によって調製することもできる。通常1~21日間の培養によって、培地中に高濃度の酢酸が蓄積する。以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0035】

【実施例】(実施例1)アセトバクター・アセチのアコニターゼ遺伝子のクローニングと該遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列の決定

(1)アコニターゼ遺伝子のクローニング

アセトバクター・アセチNo.1023 (*Acetobacter aceti* No.1023) 株 (FERM BP-2287) を1%の酢酸を含むYPG培地 (3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン) を用いて、30℃で24時間振盪培養した。培養後、培養液を遠心分離

(7,500×g、10分)して菌体を得た。また、酢酸を含まないYPG培地でも、同様にして培養して、菌体を得た。得られたこれらの菌体を、それぞれソニケーションにより破碎し、その菌体破碎液を遠心分離 (12,000×g、10分間)して得られた上澄み液を、さらに超遠心分離 (400,000×g、1時間)を行なうことによって上澄み液 (可溶性蛋白質)を得た。

【0036】この上澄み液を2×SDS-PAGE泳動緩衝液 (0.125MTris-HCl (pH6.8)、10%2-Mercaptoethanol、4%SDS、10%Sucrose、0.004%Bromophenolblue) に1:1の比率で混合し、沸騰水浴中で3分間加熱処理した。このサンプルをSDS-PAGE電気泳動した後、CBB染色し、1%の酢酸を含むYPG培地で生育したものと、酢酸を含まないYPG培地で生育したものとを比較しころ、分子量約90kDaのバンドが1%酢酸を含む培地で生育したもので発現が増幅しているのが確認された。

【0037】このように発現が増幅していたバンドをPVDF膜に転写し、アミノ末端のアミノ酸配列をプロテインシーキングエンサーにて決定した。決定したアミノ酸配列はMet-Lys-Thr-Val-Gly-His-Asp-Lys-Leu-Lys-Thr-Gly-

Argであった。

【0038】上記のアミノ酸配列を基にしてオリゴヌクレオチドを合成し、これをアセトバクター・アセチNo.1023株から定法により染色体DNAを抽出し制限酵素SphI (宝酒造社製) で完全分解したものに対して、ザザンハイブリダイゼーションを行なった。

【0039】その結果、約4.6kbpの位置にポジティブなバンドを確認した。このバンドをアガロースゲルより抽出し、大腸菌ベクターpUC19の制限酵素Sp

hI切断部位にライゲーションし、大腸菌JM109株に形質転換し、100μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地で選択した。出現したコロニーをザザンハイブリダイゼーションで用いたものと同じオリゴヌクレオチドをプローブとし、コロニーハイブリダイゼーションを行ない、ポジティブな形質転換体を単離した。その後、プラスミドDNAをこれらのポジティブな形質転換体より分離し、挿入断片の構造を制限酵素マッピングにより解析し、その結果、図1に示した約3.6kbpのSphI-XbaI断片を確認した。

【0040】(2)クローン化された遺伝子断片の塩基配列の決定

上記挿入断片の塩基配列を、サンガーのダイデオキシ・チーン・ターミネーション法によって決定した。塩基配列の決定は、両方のDNA鎖の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様にして行なった。その内、決定した3073塩基の塩基配列を、配列番号1に示した。

【0041】配列番号1記載の塩基配列中には、塩基番号354から塩基番号3065にかけて、配列番号2に記載したような904個のアミノ酸をコードするオープンリーディング・フレームの存在が確認された。配列番号2に記載されたタンパク質のN末端側のアミノ酸配列はMet-Lys-Thr-Val-Gly-His-Asp-Lys-Leu-Lys-Thr-Gly-Argであり、先に決定した該タンパク質のN末端側のアミノ酸配列と完全に一致することが確認された。

【0042】(実施例2)グルコンアセトバクター・エンタニイからのアコニターゼ遺伝子のクローニングと塩基配列及びアミノ酸配列の決定

(1)染色体DNAライプラリーの作製

グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の1株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) を6%酢酸、4%エタノールを添加したYPG培地 (3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン) で30℃にて振盪培養を行なった。培養後、培養液を遠心分離 (7,500×g、10分) し、菌体を得た。得られた菌体より、特開昭60-9489号公報に開示された方法により、染色体DNAを調製した。

【0043】上記のようにして得られた染色体DNAを制限酵素Sph Iで切断し、その後klenow fragment (宝酒造社製)処理を行なった。また、大腸菌-酢酸菌シャトルベクターpMV24を、制限酵素Sma Iで切断した。これらのDNAを適量ずつ混合し、ライゲーションキット (TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2, 宝酒造社製) を用いて連結してグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライプラリーを構築した。

【0044】(2) アコニターゼ遺伝子のクローニング 上記のようにして得られたグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライプラリーを、通常は酢酸濃度1%程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法 (バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.), 58巻、974頁, 1994年) で形質転換し、2%酢酸、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むYPG寒天培地にて、30℃で4日間培養した。

【0045】生じたコロニーを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン含むYPG培地に接種して培養し、得られた菌体からプラスミドを回収したところ、約5kbのSph I断片がクローン化されており、このプラスミドをpS1と命名した。クローン化されたDNA断片のうち、アセトバクター・アセチNo. 1023株を2%酢酸を含むYPG培地で生育可能にする断片は、図2に示した約3.5kbのSph I-Xba I断片であった。このようにして通常は酢酸濃度1%程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 1023株を2%酢酸含有培地でも増殖可能にする酢酸耐性遺伝子断片を取得した。

【0046】(3) クローン化されたDNA断片の塩基配列の決定

実施例1と同様に、アコニターゼ遺伝子を含有する断片について、塩基配列をサンガーのダイデオキシン・チーン・ターミネーション法によって決定した。その結果、配列番号3に記載した塩基配列が決定された。アセトバクター・アセチNo. 1023株の場合と同様に、配列決定は両方のDNA鎖の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様にして行なった。このうち、決定した3348塩基の塩基配列について、配列番号3に記載した。配列番号3記載の塩基配列中には、塩基番号489から塩基番号3179にかけて、配列番号4に記載したような897個のアミノ酸をコードするオープンリーディング・フレームの存在が確認された。

【0047】(実施例3) アセトバクター・アセチ由来のアコニターゼ遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

(1) アセトバクター・アセチへの形質転換
アセトバクター・アセチNo. 1023株由来のアコニ

- ターゼ遺伝子を含む断片 (配列表の配列番号1の塩基番号1~3073) をPCR法により増幅し、この増幅断片を、酢酸菌一大腸菌シャトルベクターpMV24 (アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) 55巻, 171頁, 1989年) の制限酵素Sma I切断部位に挿入し、プラスミドpACO1を作製した。なお、作製したプラスミドpACO1の挿入断片の塩基配列に変異がないことはシークエンスすることで確認した。
- 【0048】このpACO1をアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法 (バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci. Biotech. Biochem.), 58巻、974頁、1994年) によって形質転換した。形質転換株は $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン及び2%の酢酸を添加したYPG寒天培地で選択した。選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株は、定法によりプラスミドを抽出して解析し、アコニターゼ遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。
- 【0049】(2) 形質転換株の酢酸耐性
上記のようにして得られたプラスミドpACO1を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、酢酸を添加したYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。
- 【0050】具体的には、酢酸0%あるいは3%、エタノール3%、アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 100ml のYPG培地にて、30℃で振盪培養 (150rpm) を行ない、形質転換株と元株の酢酸添加培地での生育を550nmにおける吸光度を測定することで比較した。
- 【0051】その結果、図3に示すように、3%エタノールのみを添加した培地では、形質転換株、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株で生育に差は見られなかつたが、3%酢酸と3%エタノールを添加した培地では形質転換株は増殖が可能であったのに対して、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株では増殖できなかつたことが確認でき、酢酸菌のアコニターゼ遺伝子の酢酸耐性増強機能が確認できた。
- 【0052】(3) 形質転換株と元株の各種酵素活性
プラスミドpACO1を有するアンピシリン耐性の形質転換株と、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株でアコニット酸ヒドラターゼ活性 (アコニターゼ活性) をメソッド・オブ・エンザイモロジー ((Methods Enzymol.), 13巻, 26頁, 1969年) の方法に、アルコール脱水素酵素を酢酸菌の方法 (メソッド・オブ・エンザイモロジー (Methods Enzymol.), 89巻, 450頁, 1982年) 、アルデヒド脱水素酵素活性を酢酸菌の方法 (メソッド・オブ・エ

ンザイモロジー (Methods Enzymol.) 8
9巻, 491頁, 1982年) にそれぞれ準じて測定し
た。その結果を表1に示した。

	アコニット酸 ヒドラターゼ (U/mg)	アルコール 脱水素酵素 (U/mg)	アルデヒド 脱水素酵素 (U/mg)
元株	0.56	0.68	3.10
形質転換株	1.16	0.64	2.78

【0054】表1の結果より、形質転換株はアルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素の活性は元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と同レベルであったが、アコニット酸ヒドラターゼ活性については形質転換株が約2倍高く、クローニングされた遺伝子はアコニット酸ヒドラターゼ（アコニターゼ）をコードしていることが確認された。

【0055】（実施例4）アセトバクター・アセチ由来のアコニターゼ遺伝子で形質転換した形質転換株の酢酸発酵試験

実施例3で得られたプラスミドpACO1を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクターpMV24のみを有する元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と酢酸醸酵能を比較した。

	最終到達酢酸 濃度 (%)	比増殖速度 (OD660/h r)	生産速度 (%/h r)
元株	8.4	0.0307	0.106
形質転換株	10.5	0.0363	0.174

【0058】表2の結果から、形質転換株の方が、最終到達酢酸濃度、比増殖速度、生酸速度の何れにおいても、顕著に優れていることが確認できた。

【0059】（実施例5）グルコンアセトバクター・エンタニイ由来のアコニターゼ遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

（1）アセトバクター・アセチへの形質転換
グルコンアセトバクター・エンタニイの1菌株であるアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24株由来のアコニターゼ遺伝子を含む断片（配列表の配列番号1の塩基番号307～3239）をPCR法により増幅し、その結果得られた増幅断片をBamHI、EcoRIで切断し、この断片を酢酸菌一大腸菌シャトルベクターpMV24（アプライド・オブ・エンバイロメント・アンド・マイクロバイオロジー（Appl. Environ. Microbiol.）55巻, 171頁, 1989年）の制限酵素BamHI-EcoRI切断部位に挿入したプラスミドpACO1を作製した。

【0060】このpACO1をアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法（バイ

【0053】

【表1】

【0056】具体的には、5Lのミニジャー（三ツワ理化学工業社製；KMJ-5A）を用いて、酢酸1%、エタノール3%、アンピシリン100μg/mlを含む2.5LのYPG培地にて、30℃、400rpm、15.0.20vvmの通気攪拌培養を行ない、酢酸濃度3%まで発酵させた。この培養液700mlにエタノール4%、アンピシリン100μg/mlを含む1.8LのYPG培地を添加し、培地中のエタノール濃度を1%に制御し、同じ条件下で通気攪拌培養を行ない、形質転換株と元株の酢酸発酵能を比較した。その結果を表2にまとめた。

【0057】

【表2】

オサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー（Biosci. Biotech. Biochem.），58巻, 974頁, 1994年）によって形質転換した。形質転換株は100μg/mlのアンピシリン及び2%の酢酸35を添加したYPG寒天培地で選択した。選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株は、定法によりプラスミドを抽出して解析し、酢酸耐性遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

【0061】（2）形質転換株の酢酸耐性
40 上記のようにして得られたプラスミドpACO1を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、酢酸を添加したYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

【0062】具体的には、酢酸3%、エタノール3%、アンピシリン100μg/mlを含む100mlのYPG培地にて、30℃で振盪培養（150rpm）を行ない、形質転換株と元株の酢酸添加培地での生育を660nmにおける吸光度を測定することで比較した。

【0063】その結果、図4に示すように、3%酢酸と

3%エタノールを添加した培地では形質転換株は増殖が可能であったのに対して、元株アセトバクター・アセチ No. 1023株では増殖できなかつたことが確認でき、酢酸菌のアコニターゼ遺伝子の酢酸耐性増強機能が確認できた。

【0064】

【発明の効果】本発明により、酢酸耐性に関する新規

なアコニターゼ遺伝子が提供され、さらに該遺伝子を用いてより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造可能な育種株を取得することができ、該育種株を用いたより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造する方法が提供できた。

05 【0065】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsukan Group Corporation

<120> Structural gene of aconitase from acetic acid bacteria, and acetic acid bacteria transformed with said gene, and acetic acid fermentation using said transformants

<130> P02-0084

<140>

141>

160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3073

<212> DNA

<213> Acetobacter aceti

<220>

<221> CDS

<222> (354)..(3065)

<400> 1

tgctgataacc gtccagaacc agcctttctc cacggaagac acagagatcc tcggcataaa 60
gtgcgtggaaa tgcaccagct tctggccaa gggcggttgc cccagcaggg aaaggactgt 120
cagcgataac acttctcctt attgttaccg tgcaaggccg caaaaagccgg ggtgcttg 180

ttctcggtt cgctccccgc cttgtgcctt ttccaactgc cggtatgttc taggcccac 240
ggatatatcaa gccgggttgc cggcagatct ggcaggcact tggcgccaa tggatattta 300
cggtgtctg aacgcacac cagccatcg ctgtgatcg ggagagagcg att atg 356

Met

1

aaa acg gtt ggg cac gat aag cta aaa aca ggc cgc acc ctt gag gtg 404
Lys Thr Val Gly His Asp Lys Leu Lys Thr Gly Arg Thr Leu Glu Val

5 10 15

gat ggc aag acc tac cac tat ttt tcc att ccc gaa gcg gca aag acc 452
Asp Gly Lys Thr Tyr His Tyr Phe Ser Ile Pro Glu Ala Ala Lys Thr

20 25 30

att ggc gac gta agc cgc ctt ccg gtt tcg ctg aag gtt ctt ttg gaa 500
Ile Gly Asp Val Ser Arg Leu Pro Val Ser Leu Lys Val Leu Leu Glu

35 40 45

aac att ctg cgg ttt gaa gat ggg cgc tcc tac aat gtg gat gac gcc 548
Asn Ile Leu Arg Phe Glu Asp Gly Arg Ser Tyr Asn Val Asp Ala

50 55 60 65

aag gcc att gca ggc tgg ttg cca aag ggt agc agc agt aag gaa gtt 596
Lys Ala Ile Ala Gly Trp Leu Pro Lys Gly Ser Ser Ser Lys Glu Val

70 75 80

cct ttc aaa cct tca cgt att cta atg cag gac ttc gcc ggt gtt ccg	644
Pro Phe Lys Pro Ser Arg Ile Leu Met Gln Asp Phe Ala Gly Val Pro	
85 90 95	
ggt gtg gtg gat ctt gca gcc atg cgt gac ggg att gtg agc ctg aag	692
Gly Val Val Asp Leu Ala Ala Met Arg Asp Gly Ile Val Ser Leu Lys	
100 105 110	
ggt gac ccc cag aag gtg aac cca atg gtt ccg gtc aat ctg gtg atc	740
Gly Asp Pro Gln Lys Val Asn Pro Met Val Pro Val Asn Leu Val Ile	
115 120 125	
gac cat tcc gtg acg gtg gac cat gca ggc aca aaa gat gcg ctg cag	788
Asp His Ser Val Thr Val Asp His Ala Gly Thr Lys Asp Ala Leu Gln	
130 135 140 145	
gaa aac att acg ctg gaa ttt gaa cgc aac gca gaa cgt tat gcc ttc	836
Glu Asn Ile Thr Leu Glu Phe Glu Arg Asn Ala Glu Arg Tyr Ala Phe	
150 155 160	
ctg cgc tgg ggc cag gtg gcg ttt gaa aac ttc tcc gtt gtg ccg cca	884
Leu Arg Trp Gly Gln Val Ala Phe Glu Asn Phe Ser Val Val Pro Pro	
165 170 175	
gat aca ggc atc tgc cat cag gtg aac ctg gaa tac att gcc cag gtg	932
Asp Thr Gly Ile Cys His Gln Val Asn Leu Glu Tyr Ile Ala Gln Val	
180 185 190	
gca tgg acc gcc aat gtg ggc ggc aag gaa tac gtt tac ccg gat tcc	980
Ala Trp Thr Ala Asn Val Gly Gly Lys Glu Tyr Val Tyr Pro Asp Ser	
195 200 205	
ctg tac ggc aca gac agc cac acc acc atg atc aac ggt ctg ggc gtg	1028
Leu Tyr Gly Thr Asp Ser His Thr Thr Met Ile Asn Gly Leu Gly Val	
210 215 220 225	
ttg ggc tgg ggt gtg ggt att gag gct gag gcc gca atg ctg ggc	1076
Leu Gly Trp Gly Val Gly Ile Glu Ala Glu Ala Ala Met Leu Gly	
230 235 240	
cag ccc att gcc atg ctt att ccc gat gtg atc ggc ttt aag ctg aca	1124
Gln Pro Ile Ala Met Leu Ile Pro Asp Val Ile Gly Phe Lys Leu Thr	
245 250 255	
ggc aag ctg cca gaa ggc gca aca gcc acc gat ctg gtg ctg aca gtg	1172
Gly Lys Leu Pro Glu Gly Ala Thr Ala Thr Asp Leu Val Thr Val	
260 265 270	
acc cag atg ctg cgc aga aaa ggc gtg gtg ggc aag ttt gtt gaa ttc	1220
Thr Gln Met Leu Arg Arg Lys Gly Val Val Gly Lys Phe Val Glu Phe	
275 280 285	
ttt ggc ccg gca ctt gat cat ctg ccc gtg ggc gac cgt gca acc att	1268
Phe Gly Pro Ala Leu Asp His Leu Pro Val Ala Asp Arg Ala Thr Ile	
290 295 300 305	
gcc aac atg gct ccg gaa tat ggt gca act tgc ggg ttc ttc ccg gtt	1316
Ala Asn Met Ala Pro Glu Tyr Gly Ala Thr Cys Gly Phe Phe Pro Val	
310 315 320	
gat gcg ctt acg ctg gac ttc ctg cgc cag acc ggt cgt gat gaa cat	1364
Asp Ala Leu Thr Leu Asp Phe Leu Arg Gln Thr Gly Arg Asp Glu His	
325 330 335	
cgc atc aag ctg gtt gaa gaa tat ctg cgc ggc cag ggc atg ttc cgc	1412

Arg Ile Lys Leu Val Glu Glu Tyr Leu Arg Ala Gln Gly Met Phe Arg
 340 345 350
 acg cac gaa acg cca gaa cct gtc ttt aca gat gtt ctg gaa ctg gat 1460
 Thr His Glu Thr Pro Glu Pro Val Phe Thr Asp Val Leu Glu Leu Asp
 355 360 365
 ctc agc acg gtt gtg cct tct ctg gca ggg ccc aag cgt ccg cag gat 1508
 Leu Ser Thr Val Val Pro Ser Leu Ala Gly Pro Lys Arg Pro Gln Asp
 370 375 380 385
 cgc gtg gag ctg aaa agc gcc aaa acc gcg ttt gaa aaa gaa ctc atc 1556
 Arg Val Glu Leu Lys Ser Ala Lys Thr Ala Phe Glu Lys Glu Leu Ile
 390 395 400
 agc tct ttg ggt gtg gcc gct aac gat gcc gat aaa aag gtt ccg gtt 1604
 Ser Ser Leu Gly Val Ala Ala Asn Asp Ala Asp Lys Lys Val Pro Val
 405 410 415
 gcc gga acc aac tat gat ctg ggg cag ggc gat att gtt att gcc gct 1652
 Ala Gly Thr Asn Tyr Asp Leu Gly Gln Gly Asp Ile Val Ile Ala Ala
 420 425 430

 att acc tcc tgc acc aac aca tcc aac ccg gct gtg ctg att gcg gct 1700
 Ile Thr Ser Cys Thr Asn Thr Ser Asn Pro Ala Val Leu Ile Ala Ala
 435 440 445
 ggt ctg gtt gcc cgc aag gca cgt gct cta ggc ctt acg cct aag ccg 1748
 Gly Leu Val Ala Arg Lys Ala Arg Ala Leu Gly Leu Thr Pro Lys Pro
 450 455 460 465
 tgg gtg aaa acc tct ctg gct ccg ggg tct cag gtt acg gat tac 1796
 Trp Val Lys Thr Ser Leu Ala Pro Gly Ser Gln Val Val Thr Asp Tyr
 470 475 480
 ctg aac cgc tct ggc ctg acg acg gat ctg gat gcc atg ggc ttc aat 1844
 Leu Asn Arg Ser Gly Leu Thr Thr Asp Leu Asp Ala Met Gly Phe Asn
 485 490 495
 acc gtt ggg tat ggt tgc acc acc tgt atc ggt aac tcc ggt ccg ctg 1892
 Thr Val Gly Tyr Gly Cys Thr Thr Cys Ile Gly Asn Ser Gly Pro Leu
 500 505 510
 cct tct cac att gta gac gcg att gaa aac aac gac ctg gtt gct gtt 1940
 Pro Ser His Ile Val Asp Ala Ile Glu Asn Asn Asp Leu Val Ala Val
 515 520 525
 tct gtc ctg tct ggc aac cgt aac ttt gaa ggc cgt att tcc ccc aac 1988
 Ser Val Leu Ser Gly Asn Arg Asn Phe Glu Gly Arg Ile Ser Pro Asn
 530 535 540 545

 gtt cggtt ggc gac tat ctg gca agc ccg ccg ctg gtg gca tgt tcc 2036
 Val Arg Ala Asp Tyr Leu Ala Ser Pro Pro Leu Val Val Ala Cys Ser
 550 555 560
 ctt ctt ggc acc atg cgt aag gat att acg acg gaa ccg ctg ggc aca 2084
 Leu Leu Gly Thr Met Arg Lys Asp Ile Thr Thr Glu Pro Leu Gly Thr
 565 570 575
 tcc aag gat ggc aag ccg gtt tac ctg aag gat atc tgg ccg acc aac 2132
 Ser Lys Asp Gly Lys Pro Val Tyr Leu Lys Asp Ile Trp Pro Thr Asn
 580 585 590
 aag gaa att gct gac ctt att gct tct gcc atc agc cgt gac gag ttt 2180

Lys Glu Ile Ala Asp Leu Ile Ala Ser Ala Ile Ser Arg Asp Glu Phe
 595 600 605
 atc aac cgt tac aag aac gcg tcc aaa ggc acg aag gaa tgg cag ggt 2228
 Ile Asn Arg Tyr Lys Asn Ala Ser Lys Gly Thr Lys Glu Trp Gln Gly
 610 615 620 625
 ctg aag gtt gct acg ggt tct gaa acc tat ggg tgg gat ccg ccg tac 2276
 Leu Lys Val Ala Thr Gly Ser Glu Thr Tyr Gly Trp Asp Pro Pro Tyr
 630 635 640
 ttc aag cat atg gat att gaa ccc aag gct ccg ggc aat atc gaa ggt 2324
 Phe Lys His Met Asp Ile Glu Pro Lys Ala Pro Gly Asn Ile Glu Gly
 645 650 655
 gcg cgt att ctg gcc ctg ctg ggt gac aac atc acg acc gac cat atc 2372
 Ala Arg Ile Leu Ala Leu Leu Gly Asp Asn Ile Thr Thr Asp His Ile
 660 665 670
 tct ccg gca ggc tcc atc aag aag gat tcc ccg gct ggt cgt tac ctg 2420
 Ser Pro Ala Gly Ser Ile Lys Lys Asp Ser Pro Ala Gly Arg Tyr Leu
 675 680 685
 atg gaa cac ggg gtt gaa ccc aaa gac ttc aac tct tgt ggc tcc cgc 2468
 Met Glu His Gly Val Glu Pro Lys Asp Phe Asn Ser Cys Gly Ser Arg
 690 695 700 705
 cgt ggg aat gac cgc gtg atg gtg cgt ggt act ttt gcc aac atc cgt 2516
 Arg Gly Asn Asp Arg Val Met Val Arg Gly Thr Phe Ala Asn Ile Arg
 710 715 720
 atc aaa aac gaa atg ctg cct ggt acg gaa ggt ggg tat tcc aag cac 2564
 Ile Lys Asn Glu Met Leu Pro Gly Thr Glu Gly Gly Tyr Ser Lys His
 725 730 735
 ttc ccg gat ggg aag gaa ggc gcc att tac gat gtg gcc atg gaa tat 2612
 Phe Pro Asp Gly Lys Glu Gly Ala Ile Tyr Asp Val Ala Met Glu Tyr
 740 745 750
 aaa aag gac cat gtg ccg ctg gtt gtg att ggt ggc aaa gaa tac ggc 2660
 Lys Lys Asp His Val Pro Leu Val Val Ile Gly Gly Lys Glu Tyr Gly
 755 760 765
 atg ggc tct tcc cgt gac tgg gct gca aaa ggc acc ctg ttg ctg ggc 2708
 Met Gly Ser Ser Arg Asp Trp Ala Ala Lys Gly Thr Leu Leu Gly
 770 775 780 785
 gta aag gcc gtt att gct gaa agc ttt ccg ccg cgc tgc cgc act ggc 2756
 Val Lys Ala Val Ile Ala Glu Ser Phe Pro Pro Arg Cys Arg Thr Gly
 790 795 800
 aca tgc agc cgg gcg caa agt tgc tct ttc cct ttc aga ccc att ctg 2804
 Thr Cys Ser Arg Ala Gln Ser Cys Ser Phe Pro Phe Arg Pro Ile Leu
 805 810 815
 cgt tgg gcg cca ccg tca gcc ttt ctt gat ctg gtt aaa ggc cat gtg 2852
 Arg Trp Ala Pro Pro Ser Ala Phe Leu Asp Leu Val Lys Gly His Val
 820 825 830
 gac atc ctt ttt gca aat gag gat gaa atc tgc gct ttg tac gaa aca 2900
 Asp Ile Leu Phe Ala Asn Glu Asp Glu Ile Cys Ala Leu Tyr Glu Thr
 835 840 845
 gaa aat ttt gac gtt gcc gca cgt cat acc gca cag gat aca act ttt 2948
 Glu Asn Phe Asp Val Ala Ala Arg His Thr Ala Gln Asp Thr Thr Phe
 850 855 860 865

gca gcg ctc aca cgc tct ggc ttg ggc agc gtt gtc cta cac gat ggg 2996
 Ala Ala Leu Thr Arg Ser Gly Leu Gly Ser Val Val Leu His Asp Gly
 870 875 880
 caa atg acc aag gtt gcg acg gtg ccc aca cag gtt gtg gat aca cag 3044
 Gln Met Thr Lys Val Ala Thr Val Pro Thr Gln Val Val Asp Thr Gln
 885 890 895

 3073
 gcg ctg gag atg cca tgc tgc tgactgga
 Ala Leu Glu Met Pro Cys Cys
 900
 <210> 2
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> Acetobacter aceti
 <400> 2
 Met Lys Thr Val Gly His Asp Lys Leu Lys Thr Gly Arg Thr Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Lys Thr Tyr His Tyr Phe Ser Ile Pro Glu Ala Ala Lys
 20 25 30
 Thr Ile Gly Asp Val Ser Arg Leu Pro Val Ser Leu Lys Val Leu Leu
 35 40 45
 Glu Asn Ile Leu Arg Phe Glu Asp Gly Arg Ser Tyr Asn Val Asp Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ala Ile Ala Gly Trp Leu Pro Lys Gly Ser Ser Ser Lys Glu
 65 70 75 80
 Val Pro Phe Lys Pro Ser Arg Ile Leu Met Gln Asp Phe Ala Gly Val
 85 90 95

 Pro Gly Val Val Asp Leu Ala Ala Met Arg Asp Gly Ile Val Ser Leu
 100 105 110
 Lys Gly Asp Pro Gln Lys Val Asn Pro Met Val Pro Val Asn Leu Val
 115 120 125
 Ile Asp His Ser Val Thr Val Asp His Ala Gly Thr Lys Asp Ala Leu
 130 135 140
 Gln Glu Asn Ile Thr Leu Glu Phe Glu Arg Asn Ala Glu Arg Tyr Ala
 145 150 155 160
 Phe Leu Arg Trp Gly Gln Val Ala Phe Glu Asn Phe Ser Val Val Pro
 165 170 175
 Pro Asp Thr Gly Ile Cys His Gln Val Asn Leu Glu Tyr Ile Ala Gln
 180 185 190
 Val Ala Trp Thr Ala Asn Val Gly Gly Lys Glu Tyr Val Tyr Pro Asp
 195 200 205
 Ser Leu Tyr Gly Thr Asp Ser His Thr Thr Met Ile Asn Gly Leu Gly
 210 215 220
 Val Leu Gly Trp Gly Val Gly Gly Ile Glu Ala Glu Ala Ala Met Leu
 225 230 235 240
 Gly Gln Pro Ile Ala Met Leu Ile Pro Asp Val Ile Gly Phe Lys Leu
 245 250 255
 Thr Gly Lys Leu Pro Glu Gly Ala Thr Ala Thr Asp Leu Val Leu Thr
 260 265 270

Val Thr Gln Met Leu Arg Arg Lys Gly Val Val Gly Lys Phe Val Glu
 275 280 285
 Phe Phe Gly Pro Ala Leu Asp His Leu Pro Val Ala Asp Arg Ala Thr
 290 295 300
 Ile Ala Asn Met Ala Pro Glu Tyr Gly Ala Thr Cys Gly Phe Phe Pro
 305 310 315 320
 Val Asp Ala Leu Thr Leu Asp Phe Leu Arg Gln Thr Gly Arg Asp Glu
 325 330 335
 His Arg Ile Lys Leu Val Glu Glu Tyr Leu Arg Ala Gln Gly Met Phe
 340 345 350
 Arg Thr His Glu Thr Pro Glu Pro Val Phe Thr Asp Val Leu Glu Leu
 355 360 365
 Asp Leu Ser Thr Val Val Pro Ser Leu Ala Gly Pro Lys Arg Pro Gln
 370 375 380
 Asp Arg Val Glu Leu Lys Ser Ala Lys Thr Ala Phe Glu Lys Glu Leu
 385 390 395 400

 Ile Ser Ser Leu Gly Val Ala Ala Asn Asp Ala Asp Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Val Ala Gly Thr Asn Tyr Asp Leu Gly Gln Gly Asp Ile Val Ile Ala
 420 425 430
 Ala Ile Thr Ser Cys Thr Asn Thr Ser Asn Pro Ala Val Leu Ile Ala
 435 440 445
 Ala Gly Leu Val Ala Arg Lys Ala Arg Ala Leu Gly Leu Thr Pro Lys
 450 455 460
 Pro Trp Val Lys Thr Ser Leu Ala Pro Gly Ser Gln Val Val Thr Asp
 465 470 475 480
 Tyr Leu Asn Arg Ser Gly Leu Thr Thr Asp Leu Asp Ala Met Gly Phe
 485 490 495
 Asn Thr Val Gly Tyr Gly Cys Thr Thr Cys Ile Gly Asn Ser Gly Pro
 500 505 510
 Leu Pro Ser His Ile Val Asp Ala Ile Glu Asn Asn Asp Leu Val Ala
 515 520 525
 Val Ser Val Leu Ser Gly Asn Arg Asn Phe Glu Gly Arg Ile Ser Pro
 530 535 540
 Asn Val Arg Ala Asp Tyr Leu Ala Ser Pro Pro Leu Val Val Ala Cys
 545 550 555 560

 Ser Leu Leu Gly Thr Met Arg Lys Asp Ile Thr Thr Glu Pro Leu Gly
 565 570 575
 Thr Ser Lys Asp Gly Lys Pro Val Tyr Leu Lys Asp Ile Trp Pro Thr
 580 585 590
 Asn Lys Glu Ile Ala Asp Leu Ile Ala Ser Ala Ile Ser Arg Asp Glu
 595 600 605
 Phe Ile Asn Arg Tyr Lys Asn Ala Ser Lys Gly Thr Lys Glu Trp Gln
 610 615 620
 Gly Leu Lys Val Ala Thr Gly Ser Glu Thr Tyr Gly Trp Asp Pro Pro
 625 630 635 640
 Tyr Phe Lys His Met Asp Ile Glu Pro Lys Ala Pro Gly Asn Ile Glu
 645 650 655

Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Leu Gly Asp Asn Ile Thr Thr Asp His
 660 665 670
 Ile Ser Pro Ala Gly Ser Ile Lys Lys Asp Ser Pro Ala Gly Arg Tyr
 675 680 685
 Leu Met Glu His Gly Val Glu Pro Lys Asp Phe Asn Ser Cys Gly Ser
 690 695 700
 Arg Arg Gly Asn Asp Arg Val Met Val Arg Gly Thr Phe Ala Asn Ile
 705 710 715 720
 Arg Ile Lys Asn Glu Met Leu Pro Gly Thr Glu Gly Gly Tyr Ser Lys
 725 730 735
 His Phe Pro Asp Gly Lys Glu Gly Ala Ile Tyr Asp Val Ala Met Glu
 740 745 750
 Tyr Lys Lys Asp His Val Pro Leu Val Val Ile Gly Gly Lys Glu Tyr
 755 760 765
 Gly Met Gly Ser Ser Arg Asp Trp Ala Ala Lys Gly Thr Leu Leu Leu
 770 775 780
 Gly Val Lys Ala Val Ile Ala Glu Ser Phe Pro Pro Arg Cys Arg Thr
 785 790 795 800
 Gly Thr Cys Ser Arg Ala Gln Ser Cys Ser Phe Pro Phe Arg Pro Ile
 805 810 815
 Leu Arg Trp Ala Pro Pro Ser Ala Phe Leu Asp Leu Val Lys Gly His
 820 825 830
 Val Asp Ile Leu Phe Ala Asn Glu Asp Glu Ile Cys Ala Leu Tyr Glu
 835 840 845
 Thr Glu Asn Phe Asp Val Ala Ala Arg His Thr Ala Gln Asp Thr Thr
 850 855 860

Phe Ala Ala Leu Thr Arg Ser Gly Leu Gly Ser Val Val Leu His Asp
 865 870 875 880
 Gly Gln Met Thr Lys Val Ala Thr Val Pro Thr Gln Val Val Asp Thr
 885 890 895
 Gln Ala Leu Glu Met Pro Cys Cys
 900

<210> 3

<211> 3348

<212> DNA

<213> Gluconacetobacter entanii

<220>

<221> CDS

<222> (489)..(3179)

<400> 3

```

gcatgctggc tgcgatcgcc cagcgcatcg accccggccc acaggacatg gccccttca 60
ggtttcgcga aacccgcgag cacgcgcgcg aagggtggact tgccgcgcc attcgccccg 120
gtcagaagca gggcgtcgcc cgcatccagc gttaagccga cacggtccag aaccagccgt 180
tcaccgcgga aaaccgatat atttccact tccagcaggg gacggccggg gggagtaag 240
gcaggaatga cggaaatctt ccgatcggtt ggtgaagggg cgggcgggtt aaaaaaacgc 300

```

```

ctgctccgc ttcttgcata cgggtccag ctgtgtcgc aaccgcgtcc gggtatgttc 360
taccccggtt gggagatcaa gcagggtgtc cccgacaagg tcgcaaatcc cgcacctatg 420
gaagtggggc gggggaaagt ggtcatacgg gacgatccgt tgctgtatgcc tcggaggaaa 480

```

caaaggcca atg aag acg gtt ggg cac gac tca atg aaa acg gtc cgc aca 530
 Met Lys Thr Val Gly His Asp Ser Met Lys Thr Val Arg Thr
 1 5 10
 ctc aat gtg gac ggc aag acc tat cat tat ttc tca atc ccg gaa gct 578
 Leu Asn Val Asp Gly Lys Thr Tyr His Tyr Phe Ser Ile Pro Glu Ala
 15 20 25 30
 gaa aag acg atc ggt tcc gtc agc cgc ctg ccg gtc agc ctg aaa gtg 626
 Glu Lys Thr Ile Gly Ser Val Ser Arg Leu Pro Val Ser Leu Lys Val
 35 40 45
 ctg ctg gaa aac gta ctg cgg ttc gag gac ggg cat tcc tat tcg gtt 674
 Leu Leu Glu Asn Val Leu Arg Phe Glu Asp Gly His Ser Tyr Ser Val
 50 55 60
 gag gat gcc aag gcc att gcg gaa tgg ctg aag gaa ggg cgc agc acg 722
 Glu Asp Ala Lys Ala Ile Ala Glu Trp Leu Lys Glu Gly Arg Ser Thr
 65 70 75
 aag gaa gtt ccc ttc aag ccc gcg cgt atc ctg atg cag gat ttc acc 770
 Lys Glu Val Pro Phe Lys Pro Ala Arg Ile Leu Met Gln Asp Phe Thr
 80 85 90
 ggc gtt ccc gcc gtg gtt gat ctg gcc gcg atg cgc gac ggc atc ctg 818
 Gly Val Pro Ala Val Val Asp Leu Ala Ala Met Arg Asp Gly Ile Leu
 95 100 105 110
 aag ctg aag ggc gac ccg cag aag gtg aac ccg ctg gtt ccc gtc aac 866
 Lys Leu Lys Gly Asp Pro Gln Lys Val Asn Pro Leu Val Pro Val Asn
 115 120 125
 ctg gtg atc gac cat tcg gtc atg gtg gac gtg gcc ggt tcg ccc gaa 914
 Leu Val Ile Asp His Ser Val Met Val Asp Val Ala Gly Ser Pro Glu
 130 135 140
 gcg ctg cag gac aac gta acc atc gag ttc gag cgc aat ggc gaa cgc 962
 Ala Leu Gln Asp Asn Val Thr Ile Glu Phe Glu Arg Asn Gly Glu Arg
 145 150 155
 tac gcc ttc ctg cgc tgg ggc cag gaa gcg ttt gaa aac ttc tcc gtc 1010
 Tyr Ala Phe Leu Arg Trp Gly Gln Glu Ala Phe Glu Asn Phe Ser Val
 160 165 170
 gtg ccg ccg ggc acc gga atc tgc cac cag gtg aac ctg gaa tac atc 1058
 Val Pro Pro Gly Thr Gly Ile Cys His Gln Val Asn Leu Glu Tyr Ile
 175 180 185 190
 gcg cag gcg gtg tgg acg gcg aat gtg gat ggc aag gac tac gcc tat 1106
 Ala Gln Ala Val Trp Thr Ala Asn Val Asp Gly Lys Asp Tyr Ala Tyr
 195 200 205
 ccc gac acc ctg ttc ggc acg gac agc cat acc acc atg gtc aac ggc 1154
 Pro Asp Thr Leu Phe Gly Thr Asp Ser His Thr Thr Met Val Asn Gly
 210 215 220
 atg ggc gtt ctg ggc tgg ggc gtt ggc ggg atc gag gcg gaa gcc gcg 1202
 Met Gly Val Leu Gly Trp Gly Val Gly Gly Ile Glu Ala Glu Ala Ala
 225 230 235
 atg ctg ggc cag ccg atc gcc atg ctc atc ccc gac gtg atc ggc ttc 1250
 Met Leu Gly Gln Pro Ile Ala Met Leu Ile Pro Asp Val Ile Gly Phe
 240 245 250
 aag ctg gtt ggc aag ctg ccc gag ggg gcg acc gcc acc gac ctg gtg 1298

Lys Leu Val Gly Lys Leu Pro Glu Gly Ala Thr Ala Thr Asp Leu Val
 255 260 265 270
 ctg acg gtc acg cag atg ctg cgc aag aag ggc gtt gtc ggc aag ttt 1346
 Leu Thr Val Thr Gln Met Leu Arg Lys Lys Gly Val Val Gly Lys Phe
 275 280 285
 gtc gaa ttc ttc ggt cct gcc ctt gac cac ctg ccg gtt gcc gac cgt 1394
 Val Glu Phe Phe Gly Pro Ala Leu Asp His Leu Pro Val Ala Asp Arg
 290 295 300
 gcg acc atc gcc aac atg gcc ccg gaa tat ggc gcg acc tgc ggc ttc 1442
 Ala Thr Ile Ala Asn Met Ala Pro Glu Tyr Gly Ala Thr Cys Gly Phe
 305 310 315

 ttc ccg gtt gat gac ctg acg ctg gat tac ctg cgc cag acc ggc cgt 1490
 Phe Pro Val Asp Asp Leu Thr Leu Asp Tyr Leu Arg Gln Thr Gly Arg
 320 325 330
 gag gaa cac cgc atc aag ctg acg gcg gaa tac ctg aag gca cag ggc 1538
 Glu Glu His Arg Ile Lys Leu Thr Ala Glu Tyr Leu Lys Ala Gln Gly
 335 340 345 350
 atg ttc cgt cat gcc gaa tcg gcg cac ccc gtg ttc acc gat acg ctg 1586
 Met Phe Arg His Ala Glu Ser Ala His Pro Val Phe Thr Asp Thr Leu
 355 360 365
 gaa ctc aac ctt gag acc atc gtg ccg tcc atc gcc ggc ccc aag cgc 1634
 Glu Leu Asn Leu Glu Thr Ile Val Pro Ser Ile Ala Gly Pro Lys Arg
 370 375 380
 ccg cag gac cgc gtc gtg ctg aag ggt gcg gac aag gcg ttc gag aag 1682
 Pro Gln Asp Arg Val Val Leu Lys Gly Ala Asp Lys Ala Phe Glu Lys
 385 390 395
 gaa ctg acc ggc agc ctg ggc gtg ccc gaa gcc gac aag gac aag aag 1730
 Glu Leu Thr Gly Ser Leu Gly Val Pro Glu Ala Asp Lys Asp Lys Lys
 400 405 410
 gcc aag gtg gtc acc aat tac gag atc ggt cac ggc gac gtg gtg 1778
 Ala Lys Val Ala Gly Thr Asn Tyr Glu Ile Gly His Gly Asp Val Val
 415 420 425 430
 atc gcg gcc atc acc tca tgc acc aac acc tcc aac ccc gcc gtg ctg 1826
 Ile Ala Ala Ile Thr Ser Cys Thr Asn Thr Ser Asn Pro Ala Val Leu
 435 440 445
 atc gcg gca ggc ctg gtg gcg aaa aag gca cgt gcg ctg ggc ctg aag 1874
 Ile Ala Ala Gly Leu Val Ala Lys Lys Ala Arg Ala Leu Gly Leu Lys
 450 455 460
 ccc aag ccg tgg gtg aag acc tcg ctc gca ccg gga tcg cag gtt gtg 1922
 Pro Lys Pro Trp Val Lys Thr Ser Leu Ala Pro Gly Ser Gln Val Val
 465 470 475
 acc gac tac ctc aac ccg gcg ggc ctg cag gcc gaa ctg gac gcg atg 1970
 Thr Asp Tyr Leu Asn Arg Ala Gly Leu Gln Ala Glu Leu Asp Ala Met
 480 485 490
 ggc ttc aac acc gtg ggc tat ggc tgc acg acc tgt atc ggc aac tcc 2018
 Gly Phe Asn Thr Val Gly Tyr Gly Cys Thr Thr Cys Ile Gly Asn Ser
 495 500 505 510
 ggc ccg ctg gaa gat cac atc gtc gat gcg atc gaa ggc aac aag ctg 2066
 Gly Pro Leu Glu Asp His Ile Val Asp Ala Ile Glu Gly Asn Lys Leu

515	520	525	
gtt gcg gtg tcg gtc ctg tcg ggc aac cgt aac ttc gaa ggc cgt att			2114
Val Ala Val Ser Val Leu Ser Gly Asn Arg Asn Phe Glu Gly Arg Ile			
530	535	540	
tcg ccg aac gtg cgc gcc aac tac ctg gcc agc ccg ccg ctg gtc gtg			2162
Ser Pro Asn Val Arg Ala Asn Tyr Leu Ala Ser Pro Pro Leu Val Val			
545	550	555	
gct tat tcc ctg ctg ggc acc atg cgt gag gac atc acc acc acg ccg			2210
Ala Tyr Ser Leu Leu Gly Thr Met Arg Glu Asp Ile Thr Thr Thr Pro			
560	565	570	
ctg ggc acc tcc aag gat ggc aag ccg gtg tac ctg aag gac atc tgg			2258
Leu Gly Thr Ser Lys Asp Gly Lys Pro Val Tyr Leu Lys Asp Ile Trp			
575	580	585	590
ccg acc aac cat gaa atc gcc gcc ctg atg ggt tcc gcc atc acg cgt			2306
Pro Thr Asn His Glu Ile Ala Ala Leu Met Gly Ser Ala Ile Thr Arg			
595	600	605	
gag gag ttc atc aac ccg tac aag cac gta agc cag ggc acg aag gaa			2354
Glu Glu Phe Ile Asn Arg Tyr Lys His Val Ser Gln Gly Thr Lys Glu			
610	615	620	
tgg cag gcg ctg aag gtc gcc acc ggt tcc gag acg tac aag tgg gat			2402
Trp Gln Ala Leu Lys Val Ala Thr Gly Ser Glu Thr Tyr Lys Trp Asp			
625	630	635	
gca tca tcc acc tac gtg cag gat ccg ccg tac ttc cag gac atc acg			2450
Ala Ser Ser Thr Tyr Val Gln Asp Pro Pro Tyr Phe Gln Asp Ile Thr			
640	645	650	
ccc gaa ccc aag ccg cgt ggc gac atc atc ggt gcg cgc ctg ctg gcg			2498
Pro Glu Pro Lys Pro Arg Gly Asp Ile Ile Gly Ala Arg Leu Leu Ala			
655	660	665	670
ctg ctg ggt gac aac atc acg acc gac cat atc tcg cct gct ggc gcg			2546
Leu Leu Gly Asp Asn Ile Thr Thr Asp His Ile Ser Pro Ala Gly Ala			
675	680	685	
atc aag gaa agc tcg cct gcc ggc aag tac ett gaa gag cat ggc gtc			2594
Ile Lys Glu Ser Ser Pro Ala Gly Lys Tyr Leu Glu Glu His Gly Val			
690	695	700	
gct aag aaa gga ctt cac tcc tac ggt tcg cgt cgt ggc aat gac cgc			2642
Ala Lys Lys Gly Leu His Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Asn Asp Arg			
705	710	715	
gtg atg gtg cgt ggc acg ttt gcc aac atc cgc atc aag aac gag atg			2690
Val Met Val Arg Gly Thr Phe Ala Asn Ile Arg Ile Lys Asn Glu Met			
720	725	730	
ctg ccc ggc acc gaa ggg ggc gtg tcc aag cac ttc ccg gac ggc aag			2738
Leu Pro Gly Thr Glu Gly Lys Val Ser Lys His Phe Pro Asp Gly Lys			
735	740	745	750
gaa ggc tcc atc tat gat gtc gcg atg gaa tac aag aag gag ggc gtg			2786
Glu Gly Ser Ile Tyr Asp Val Ala Met Glu Tyr Lys Lys Glu Gly Val			
755	760	765	
ccc ctg gtc gtg atc ggc ggc aag gaa tac ggc atg ggc tcc tca cgc			2834
Pro Leu Val Val Ile Gly Gly Lys Glu Tyr Gly Met Gly Ser Ser Arg			
770	775	780	

gac tgg gcg gcc aag ggc acc ctg ctg ggc gtg cgt gcg gtg att 2882
 Asp Trp Ala Ala Lys Gly Thr Leu Leu Leu Gly Val Arg Ala Val Ile
 785 790 795
 gcc gaa agc ttc gag cgt atc cac cgt tcc aac ctg gtg ggc atg ggc 2930
 Ala Glu Ser Phe Glu Arg Ile His Arg Ser Asn Leu Val Gly Met Gly
 800 805 810
 gtg ctg ccg ctg ctg ttt gaa gaa ggc acg acg cgc aag acg ctg ggc 2978
 Val Leu Pro Leu Leu Phe Glu Glu Gly Thr Thr Arg Lys Thr Leu Gly
 815 820 825 830
 ctg aag ggt gac gag acc ttc gaa atc cgc ggt ctg gac aag atc acg 3026
 Leu Lys Gly Asp Glu Thr Phe Glu Ile Arg Gly Leu Asp Lys Ile Thr
 835 840 845
 ccg cgt atg acg atg acg atg aca atc acc cgc gcc gat ggc tcc aag 3074
 Pro Arg Met Thr Met Thr Ile Thr Arg Ala Asp Gly Ser Lys
 850 855 860
 cag gac gtt ccg ctg ctg tgc cgt gtc gat acg ctg gac gag gtg gag 3122
 Gln Asp Val Pro Leu Leu Cys Arg Val Asp Thr Leu Asp Glu Val Glu
 865 870 875
 tat ttc cgc aat ggc ggc att ctc cag acc gtg ctg cgt ggc atg acc 3170
 Tyr Phe Arg Asn Gly Gly Ile Leu Gln Thr Val Leu Arg Gly Met Thr
 880 885 890
 aag gcc gcg taatcacatg atccggcccg gttccggcgg 3219
 Lys Ala Ala
 895
 taaagacggc ggtccgtatc acacggggccg ccgtttttt atggcagat catatatgca 3279
 tattcagcat aggttaccgg tgttaccgtt gcattttaca catatcggtg gtgtctttc 3339
 tctgtattg 3348
 <210> 4
 <211> 897
 <212> PRT
 <213> Gluconacetobacter entanii
 <400> 4
 Met Lys Thr Val Gly His Asp Ser Met Lys Thr Val Arg Thr Leu Asn
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Lys Thr Tyr His Tyr Phe Ser Ile Pro Glu Ala Glu Lys
 20 25 30
 Thr Ile Gly Ser Val Ser Arg Leu Pro Val Ser Leu Lys Val Leu Leu
 35 40 45
 Glu Asn Val Leu Arg Phe Glu Asp Gly His Ser Tyr Ser Val Glu Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ala Ile Ala Glu Trp Leu Lys Glu Gly Arg Ser Thr Lys Glu
 65 70 75 80
 Val Pro Phe Lys Pro Ala Arg Ile Leu Met Gln Asp Phe Thr Gly Val
 85 90 95
 Pro Ala Val Val Asp Leu Ala Ala Met Arg Asp Gly Ile Leu Lys Leu
 100 105 110
 Lys Gly Asp Pro Gln Lys Val Asn Pro Leu Val Pro Val Asn Leu Val
 115 120 125
 Ile Asp His Ser Val Met Val Asp Val Ala Gly Ser Pro Glu Ala Leu

130	135	140
Gln Asp Asn Val Thr Ile Glu Phe Glu Arg Asn Gly Glu Arg Tyr Ala		
145	150	155
Phe Leu Arg Trp Gly Gln Glu Ala Phe Glu Asn Phe Ser Val Val Pro		160
165	170	175
Pro Gly Thr Gly Ile Cys His Gln Val Asn Leu Glu Tyr Ile Ala Gln		
180	185	190
Ala Val Trp Thr Ala Asn Val Asp Gly Lys Asp Tyr Ala Tyr Pro Asp		
195	200	205
Thr Leu Phe Gly Thr Asp Ser His Thr Thr Met Val Asn Gly Met Gly		
210	215	220
Val Leu Gly Trp Gly Val Gly Gly Ile Glu Ala Glu Ala Ala Met Leu		
225	230	235
Gly Gln Pro Ile Ala Met Leu Ile Pro Asp Val Ile Gly Phe Lys Leu		240
245	250	255
Val Gly Lys Leu Pro Glu Gly Ala Thr Ala Thr Asp Leu Val Leu Thr		
260	265	270
Val Thr Gln Met Leu Arg Lys Lys Gly Val Val Gly Lys Phe Val Glu		
275	280	285
Phe Phe Gly Pro Ala Leu Asp His Leu Pro Val Ala Asp Arg Ala Thr		
290	295	300
Ile Ala Asn Met Ala Pro Glu Tyr Gly Ala Thr Cys Gly Phe Phe Pro		
305	310	315
Val Asp Asp Leu Thr Leu Asp Tyr Leu Arg Gln Thr Gly Arg Glu Glu		320
325	330	335
His Arg Ile Lys Leu Thr Ala Glu Tyr Leu Lys Ala Gln Gly Met Phe		
340	345	350
Arg His Ala Glu Ser Ala His Pro Val Phe Thr Asp Thr Leu Glu Leu		
355	360	365
Asn Leu Glu Thr Ile Val Pro Ser Ile Ala Gly Pro Lys Arg Pro Gln		
370	375	380
Asp Arg Val Val Leu Lys Gly Ala Asp Lys Ala Phe Glu Lys Glu Leu		
385	390	395
Thr Gly Ser Leu Gly Val Pro Glu Ala Asp Lys Asp Lys Ala Lys		400
405	410	415
Val Ala Gly Thr Asn Tyr Glu Ile Gly His Gly Asp Val Val Ile Ala		
420	425	430
Ala Ile Thr Ser Cys Thr Asn Thr Ser Asn Pro Ala Val Leu Ile Ala		
435	440	445
Ala Gly Leu Val Ala Lys Lys Ala Arg Ala Leu Gly Leu Lys Pro Lys		
450	455	460
Pro Trp Val Lys Thr Ser Leu Ala Pro Gly Ser Gln Val Val Thr Asp		
465	470	475
Tyr Leu Asn Arg Ala Gly Leu Gln Ala Glu Leu Asp Ala Met Gly Phe		480
485	490	495
Asn Thr Val Gly Tyr Gly Cys Thr Thr Cys Ile Gly Asn Ser Gly Pro		
500	505	510
Leu Glu Asp His Ile Val Asp Ala Ile Glu Gly Asn Lys Leu Val Ala		

515	520	525
Val Ser Val Leu Ser Gly Asn Arg Asn Phe Glu Gly Arg Ile Ser Pro		
530	535	540
Asn Val Arg Ala Asn Tyr Leu Ala Ser Pro Pro Leu Val Val Ala Tyr		
545	550	555
Ser Leu Leu Gly Thr Met Arg Glu Asp Ile Thr Thr Thr Pro Leu Gly		
565	570	575
Thr Ser Lys Asp Gly Lys Pro Val Tyr Leu Lys Asp Ile Trp Pro Thr		
580	585	590
Asn His Glu Ile Ala Ala Leu Met Gly Ser Ala Ile Thr Arg Glu Glu		
595	600	605
Phe Ile Asn Arg Tyr Lys His Val Ser Gln Gly Thr Lys Glu Trp Gln		
610	615	620
Ala Leu Lys Val Ala Thr Gly Ser Glu Thr Tyr Lys Trp Asp Ala Ser		
625	630	635
Ser Thr Tyr Val Gln Asp Pro Pro Tyr Phe Gln Asp Ile Thr Pro Glu		
645	650	655
Pro Lys Pro Arg Gly Asp Ile Ile Gly Ala Arg Leu Leu Ala Leu Leu		
660	665	670
Gly Asp Asn Ile Thr Thr Asp His Ile Ser Pro Ala Gly Ala Ile Lys		
675	680	685
Glu Ser Ser Pro Ala Gly Lys Tyr Leu Glu Glu His Gly Val Ala Lys		
690	695	700
Lys Gly Leu His Ser Tyr Gly Ser Arg Arg Gly Asn Asp Arg Val Met		
705	710	715
Val Arg Gly Thr Phe Ala Asn Ile Arg Ile Lys Asn Glu Met Leu Pro		
725	730	735
Gly Thr Glu Gly Val Ser Lys His Phe Pro Asp Gly Lys Glu Gly		
740	745	750
Ser Ile Tyr Asp Val Ala Met Glu Tyr Lys Lys Glu Gly Val Pro Leu		
755	760	765
Val Val Ile Gly Gly Lys Glu Tyr Gly Met Gly Ser Ser Arg Asp Trp		
770	775	780
Ala Ala Lys Gly Thr Leu Leu Leu Gly Val Arg Ala Val Ile Ala Glu		
785	790	795
Ser Phe Glu Arg Ile His Arg Ser Asn Leu Val Gly Met Gly Val Leu		
805	810	815
Pro Leu Leu Phe Glu Glu Gly Thr Thr Arg Lys Thr Leu Gly Leu Lys		
820	825	830
Gly Asp Glu Thr Phe Glu Ile Arg Gly Leu Asp Lys Ile Thr Pro Arg		
835	840	845
Met Thr Met Thr Met Thr Ile Thr Arg Ala Asp Gly Ser Lys Gln Asp		
850	855	860
Val Pro Leu Leu Cys Arg Val Asp Thr Leu Asp Glu Val Glu Tyr Phe		
865	870	875
Arg Asn Gly Gly Ile Leu Gln Thr Val Leu Arg Gly Met Thr Lys Ala		
885	890	895
Ala		

<210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial sequence:primer
 <400> 5
 gagaggcatt atgaaaacgg ttgggcaccc ataag 35
 <210> 6
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial sequence:primer
 <400> 6
 tccagtcagc agcatggcat ctccagcgcc tgtgt 35

【0066】

【配列表のフリーテキスト】配列番号5：プライマー

配列番号6：プライマー

【図面の簡単な説明】

【図1】SphIを用いてクローニングされたアセトバクター・アセチ由来の遺伝子断片の制限酵素地図とアコニターゼ遺伝子の位置、及びpACO1への挿入断片の概略図。

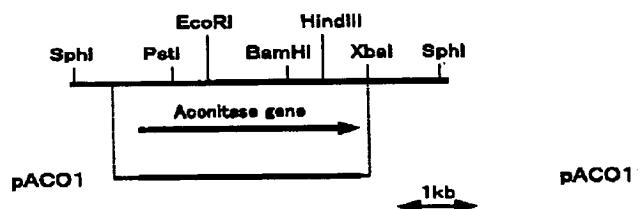
【図2】SphIを用いてクローニングされたグルコン

アセトバクター・エンタニイ由来の遺伝子断片の制限酵素地図とアコニターゼ遺伝子の位置、及びpACO1 20 への挿入断片の概略図。

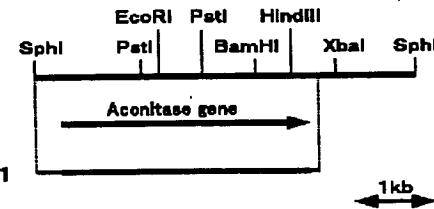
【図3】アセトバクター・アセチ由来のアコニターゼ遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の培養経過を示す図面。

【図4】グルコンアセトバクター・エンタニイ由来のアコニターゼ遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の酢酸含有培地での培養経過を示す図面。

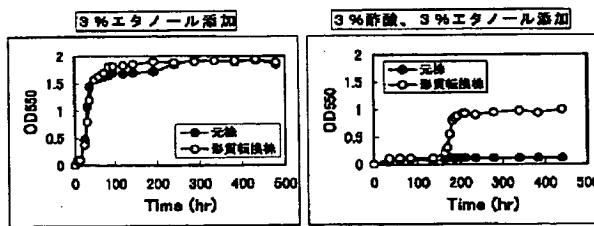
【図1】



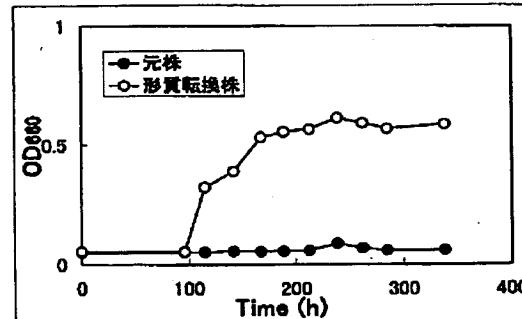
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

C 12 R 1:02)

識別記号

F I

テマコート⁸ (参考)